

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659445

研究課題名(和文)INTS6による新規脂肪分化調節機構の解明と肥満治療への展開

研究課題名(英文)Role of INTS6 in the adipose differentiation

研究代表者

浅野 知一郎(Asano, Tomoichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70242063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、インスリンシグナル下流に位置するAS160を含有する複合体にINTS6と名付けられたタンパクが含まれることを世界に先駆けて見出した。INTS6は2005年には、David Baillyらによりこの蛋白質がsmall nuclear RNAのプロセッシングに關与するIntegrator complexと呼ばれる蛋白質複合体のサブユニットの1つとして含まれていることが報告され、INTS6/DICE1と改名された。我々は、脂肪細胞の分化に伴って、INTS6の発現量が顕著に上昇すること、また、INTS6をノックダウンさせると脂肪細胞への分化が抑制されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that expression levels of IntS6 and IntS11, subunits of the Integrator complex, were increased in 3T3-L1 cells in the period when the cells reached confluence and differentiated into adipocytes, while being reduced to basal levels after the completion of differentiation. Suppression of IntS6 or IntS11 expression using siRNAs in 3T3-L1 pre-adipocytes markedly inhibited differentiation into mature adipocytes. These findings demonstrate that increased expression of Integrator complex subunits is an indispensable event in adipose differentiation. Although further study is necessary to elucidate the underlying mechanism, the processing of U1, U2 small nuclear RNAs may be involved in cell differentiation steps.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：INTS6 脂肪細胞 代謝 分化 肥満

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞の増加および増大は、メタボリックシンドロームの発症に根幹的役割を果たしている。脂肪細胞の分化はインスリン、グルココルチコイド、血清中の増殖因子などの刺激、さらには細胞内 cAMP 濃度の上昇などを引き金に CREB, C/EBPs, KLF5, PPAR などの転写因子が協調的に発現誘導されることで導かれる。しかし、脂肪分化調節に関与するタンパク群の全貌は未だ明らかになっておらず、例えば、我々は、Pin1 と名付けられたプロリン異性化酵素が脂肪細胞分化に極めて重要な役割を果たしていることを報告するなど、多様な調節機構の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

我々は、脂肪細胞のグルコース取り込みに重要な働きをしているインスリンシグナル下流タンパク AS160 を含有する複合体に INTS6 と名付けられたタンパクが含まれることを世界に先駆けて見出した。INTS6 は 1999 年に癌抑制遺伝子として同定された DICE1(deleted in cancer 1)と同一であり、分子量は約 100kDa、N 末端側に VWF domain、C 末端側に DEAD box domain を有している。2005 年には、David Baillat らによりこの蛋白質が small nuclear RNA のプロセッシングに関与する Integrator complex と呼ばれる蛋白質複合体のサブユニットの 1 つとして含まれていることが報告され、INTS6/DICE1 と改名された。INTS6 の欠損は癌化に関わる機序の一つとして示唆されているように、細胞増殖には障害を与えない。我々は、INTS6 の発現が脂肪細胞の分化誘導に伴って上昇すること、また、INTS6 を欠損させると、PPAR や C/EBP の mRNA、タンパクとも発現誘導は正常であるにも関わらず、脂肪分化が完全に抑制されることを見出し、INTS6 が脂肪細胞分化の過程にどのように関与するかを検討する計画を立案することになった。

3. 研究の方法

培養細胞、マウス及び患者からのサンプルを用いて、下記の研究を行う。

(1) INTS6 が脂肪細胞分化を制御する機序解明 (DNA エクソンアレイと 3' アレイの比較、PPAR や c/EBP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンシング (Chip-Seq)、INTS6 含有複合体構成タンパクの網羅的同定)

(2) 脂肪細胞特異的 INTS6 遺伝子欠損マウス

の作成と表現型の解析

(3) 糖尿病患者における INTS6 の SNP 解析と脂肪組織における INTS6 発現量の測定

(4) INTS6 の機能を阻害する薬剤スクリーニング系の開発

これらから、脂肪分化制御の新しい調節機構を解明し、肥満の新規治療方法や遺伝的素因の発見に役立てる。

4. 研究成果

我々は、3T3L-1 マウス前駆脂肪細胞での siRNA を用いたスクリーニングを行い INTS6 の KD により脂肪分化がほぼ完全に抑制されることを見いだした。INTS6 を KD した細胞は鏡検上で脂肪分化能を失い、ウエスタンブロットティングでは GLUT4, FABP4, Perilipin といった PPAR 依存性の遺伝子発現がほぼ完全に抑制されていた。驚いたことに INTS6 の KD により脂肪分化能を失った細胞においても分化誘導刺激に対して PPAR, C/EBP の蛋白質発現はウエスタンブロットティングで正常であった。我々は INTS6 の発現が脂肪細胞の分化誘導に伴って上昇することを見いだしており、その点からもこの蛋白質が脂肪分化に必要であることが示唆された。また、INTS6 が GLUT4, FABP4, Perilipin といった蛋白質の安定性に関わっている可能性も考え、proteasome inhibitor, lysosome inhibitor を用いた蛋白質分解経路の阻害実験を行ったが、いずれの実験においても蛋白質分解系への INTS6 の関与は否定的であった。

INTS6 は 1999 年に癌抑制遺伝子として同定された DICE1(deleted in cancer 1)と同一であり、分子量は約 100kDa、N 末端側に VWF domain、C 末端側に DEAD box domain を有している。2005 年には、David Baillat らによりこの蛋白質が U1, U2 small nuclear RNA 3' 末端のプロセッシングを行う Integrator complex と呼ばれる蛋白質複合体の 12 サブユニットのうちの一つであることが報告され、INTS6/DICE1 と改名されたという経緯がある。我々は INTS6 の KD による脂肪分化抑制が Integrator complex の機能抑制によるものか、それとも INTS6 の KD のみで見られる独自の経路を介する現象なのか、を検討する目的で、Integrator complex の活性中心サブユニットである Int11 の KD を行った。結果、Ints6 KD と同様に完全な脂肪分化の抑制が観察された。以上の結果より我々は、INTS6 の KD により Integrator complex の機能が抑制され結果として U1, U2 snRNP complex の形

成が低下し、mRNA のスプライシングに異常を生じているのではないかと考えている。mRNA のスプライシング機構は複雑であり不明な部分も多く存在するが、snRNPs が必要不可欠であることが知られている。Major type、minor type の二つの経路が存在し、哺乳動物の遺伝子の 99% 以上は前者によるスプライシングを受ける。Major type splicing では U1,2,4,5,6 snRNP が spliceosome を形成しそれぞれの complex が 1 : 1 対応で機能している。しかし細胞内では U1 snRNP の濃度が飛び抜けて高いことが知られている。最近 U1 snRNP がスプライシング前の pre-messenger RNA の特定の配列に会合し、異常な切断やその断端のポリアデニル化から保護しているという報告がなされ、U1 snRNP の細胞内濃度が高い理由の 1 つであると述べられている。しかし、U1 snRNP による mRNA 保護の必要性には遺伝子によって明らかな差も存在しており、我々は PPAR が U1 snRNP による保護の必要性が低い遺伝子である可能性も考えている。現在、通常の gene chip のみならずエキソアレイも用いて、INTS6 KD によりどのような遺伝子の mRNA がどのように影響を受けるのか検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 21 件)

1. Okubo, H., Sakoda, H., Nakatsu, Y., Asano, T. (14 人 : 14 番目) *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against non-alcoholic steatohepatitis development in a rodent model. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 305; G911-8, 2013 査読有
2. Zhang, J., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Asano, T. (19 人 : 19 番目) Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1 (IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. J. Biol. Chem. 288; 20692-701, 2013 査読有
3. Kushiya, A., Nakatsu, Y., Asano, T. (26 人 : 26 番目) Resistin-Like Molecule Is Abundantly Expressed in Foam Cells and Is Involved in Atherosclerosis Development. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33; 1986-93, 2013 査読有
4. Ozoe, A., Sone, M., Fukushima, T., Asano, T. (9 人 : 8 番目) Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Forms a Ribonucleoprotein Complex Associated with Polysomes FEBS Letters 587; 2319-24, 2013 査読有
5. Iwashita, M., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Asano, T. (10 人 : 10 番目) Valsartan restores inflammatory response by macrophages in adipose and hepatic tissues of LPS-infused mice Adipocyte. 2; 28-32, 2013 査読有
6. Otani, Y., Nakatsu, Y., Asano, T. (14 人 : 14 番目) Integrator complex plays an essential role in adipose differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 434; 197-202, 2013 査読有
7. Saito, T., Hasegawa, Y., Asano, T. (14 人 : 11 番目) Importance of endothelial NF- κ B signalling in vascular remodelling and aortic aneurysm formation. Cardiovascular Res. 97; 106-14, 2013 査読有
8. 浅野 知一郎, 中津 祐介 mTORC1/2 による代謝調節 内分泌・糖尿病・代謝内科 37(6), 667-675, 2013 査読無
9. 浅野 知一郎, 大久保 博史, 中津 祐介 SGLT2 阻害薬の作用機序と治療への展望 (特集 糖尿病治療薬の最前線 : 臨床試験・臨床疫学的観点も含めて) 医薬ジャーナル 49(10), 94-99, 2013 査読無
10. Nakatsu, Y., Otani, Y., Fukushima, T., Asano, T. (21 人 : 21 番目) Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. J. Biol. Chem. 287: 44526-35, 2012 査読有
11. Kumamoto, S., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Asano, T. (13 人 : 13 番目) Angiotensin receptor 1 blocker valsartan normalizes gene expression profiles of 3T3-L1 adipocytes altered by co-culture with LPS-treated RAW264.7 macrophages Obesity Res Clin Pract. 6: e288-e297, 2012 査読有

12. Fukushima, T., Nakamura, T., Nakatsu, Y., Asano, T. (9人: 7番目) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity bound to insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, which is continuously sustained by IGF-I stimulation, is required for IGF-I-induced cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 287: 29713-21, 2012 査読有
13. Yoshihara, H., Fukushima, T., Asano, T. (13人: 10番目) Insulin/insulin-like growth factor (IGF) stimulation abrogates an association between a deubiquitinating enzyme USP7 and insulin receptor substrates (IRSs) followed by proteasomal degradation of IRSs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423; 122-7, 2012 査読有
14. Uchida, T., Furumai, K., Asano, T. (8人: 6番目) Prolyl isomerase Pin1 regulates mouse embryonic fibroblast differentiation into adipose cells. *PLoS One* 2012;7(3):e31823 査読有
15. Hasegawa, Y., Saito, T., Asano, T. (14人: 11番目) Blockade of the nuclear factor- κ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation* 125(9):1122-33, 2012 査読有
16. Iwashita, M., Sakoda, H., Nakatsu, Y., Asano, T. (15人: 15番目) Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR γ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in co-cultured adipocytes. *Am. J. Physiol. Endo. Metab.* 302; E286-96, 2012 査読有
17. Kushiya, A., Okubo, H., Asano, T. (17人: 17番目) Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32; 291-8, 2012 査読有
18. Kikuchi, T., Zhang, J., Nakatsu, Y., Asano, T. (14人: 14番目) Pin1 associates with and induces translocation of CRTCL2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity *Obesity Res Clin Pract.* 6: e215-e224, 2012 査読有
19. Nakarai, H., Yamashita, A., Asano, T. (12人: 10番目) Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications *Innate Immun.* 18: 164-70, 2012 査読有
20. 中津 祐介, 浅野 知一郎 AMPK を介するエネルギー代謝調節 *日本薬理学雑誌* 140(3), 138-139, 2012 査読無
21. 大久保 博史, 中津 祐介, 浅野 知一郎 糖尿病治療の分子標的としてのグルコーストランスポーター (特集 新たな創薬ターゲットとしてのトランスポーター : 明らかになるその構造と新機能) *細胞工学* 31(5), 548-552, 2012 査読無
- [学会発表](計 21件)
1. 浅野知一郎 第 10 回九州先進糖尿病研究会(招待講演) メタボリックシンドローム発症におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 2013 年 9 月 7 日 福岡
 2. 浅野知一郎 第 45 回日本動脈硬化学会・学術集会(招待講演) キサンチンオキシダーゼ阻害薬による動脈硬化予防の可能性 2013 年 7 月 19 日 東京
 3. 中津祐介、岩下未咲、松永泰花、福嶋俊明、迫田秀之、櫛山暁史、鎌田英明、内田隆史、浅野知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 を介した AMPK 機能制御機構の解明 第 25 回分子糖尿病学シンポジウム 2013 年 12 月 7 日 大阪
 4. 中津祐介、大久保博史、大谷裕一郎、松永泰花、山本屋武、藤城緑、鎌田英明、内田隆史、浅野知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 は AMPK と PPAR を制御して脂質代謝に関与する。第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 5. 岩下未咲、大久保博史、迫田秀之、藤城緑、櫛山暁史、中津祐介、福嶋俊明、新城尊徳、西村英紀、浅野知一郎 ストレプトゾトシン処理後の膵ランゲルハンス島に対する DPP4 阻害薬 SK-0403 の改善作用 第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 6. 松永泰花、大谷裕一郎、福嶋俊明、中津祐介、迫田秀之、山本屋武、鎌田英明、

- 浅野知一郎 Integrator complex は脂肪細胞分化に必須の役割を果たしている 第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
7. 山下明子、箆方厚之、岩下未咲、鈴木茂樹、安孫子宣光、櫛山暁史、浅野知一郎、西村英紀 低濃度 LPS 刺激条件下のメサンギウム細胞・マクロファージ共培養系におけるメサンギウム細胞の網羅的遺伝子解析 第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 8. 新城尊徳、岩下未咲、中津祐介、迫田秀之、藤城緑、櫛山暁史、菊池貴子、西村英紀、浅野知一郎 DPP4 阻害薬 SK-0403 はマクロファージ共培養系における脂肪細胞の炎症遺伝子の発現を抑制する。第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 9. 大久保博史、福嶋俊明、新城尊徳、西村英紀、藤城緑、櫛山暁史、菊池貴子、浅野知一郎 Lactobacillus casei strain Shirota (LcS) 投与による非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の改善作用 第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 10. 山本屋武、中津祐介、松永泰花、新城尊徳、西村英紀、迫田秀之、櫛山暁史、鎌田英明、内田隆史、浅野知一郎 脂肪酸合成酵素における Pin1 の作用 第 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 11. 菊池貴子、迫田秀之、櫛山暁史、藤城緑、山本屋武、金子直、山崎広樹、浅野知一郎、河津捷二 高脂肪食負荷マウスにおける mTORC2 の糖脂質代謝に果たす役割の検討 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 12. 藤城緑、中津祐介、大谷裕一郎、大久保博史、岩下未咲、西村英紀、迫田秀之、櫛山暁史、菊池貴子、浅野知一郎 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に対するクエン酸モサブリド投与の効果 56 回日本糖尿病学会 2013 年 5 月 16 日 熊本
 13. 櫛山暁史、大久保博史、迫田秀之、菊池貴子、中津祐介、山本屋武、山崎広貴、藤城緑、門脇孝、鎌田英明、河津捷二、浅野知一郎 インスリン抵抗性および大血管障害におけるマクロファージ由来 resistin like molecule の意義 第 24 回分子糖尿病学シンポジウム 2012 年 12 月 8 日 東京
 14. 山下明子、岩下未咲、鈴木茂樹、櫛山暁史、安孫子宣光、浅野知一郎、西村英紀 マクロファージと共存する脂肪細胞を LPS 刺激した際に発現変動する miRNA の網羅的解析 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 17 日 横浜
 15. 新城尊徳、浅野知一郎、西村英紀、福嶋俊明、大久保博史、郭榮、岩下未咲、藤城緑、菊池貴子 DPP4 阻害薬が炎症性サイトカインならびにインスリンシグナルへ及ぼす影響の検討 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 17 日 横浜
 16. 中津祐介、張君、郭榮、大久保博史、迫田秀之、櫛山暁史、山本屋武、鎌田英明、浅野知一郎 非アルコール性脂肪性肝炎発症における肝および血球系細胞のプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 18 日 横浜
 17. 大谷裕一郎、中津祐介、福嶋俊明、大久保博史、郭榮、迫田秀之、櫛山暁史、浅野知一郎 脂肪細胞分化における INTS6 の役割 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 18 日 横浜
 18. 福嶋俊明、吉原英人、拍野史彦、佐拍秦、田中啓二、伊藤昭博、吉田稔、中津祐介、迫田秀之、鎌田英明、高橋伸一郎、浅野知一郎 Nedd4 はインスリン受容体基質 (IRS)-2 を介したインスリン/インスリン様成長因子 (IGF) のシグナル・生理活性を増強する。55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 19 日 横浜
 19. 山本屋武、郭榮、張君、中津祐介、大久保博史、迫田秀之、藤城緑、門脇孝、浅野知一郎 プロリン異性化酵素 Par14 と Pin1 のインスリンシグナルと糖・脂質代謝における役割 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 19 日 横浜
 20. 大久保博史、郭榮、福嶋俊明、櫛山暁史、菊池貴子、藤城緑、浅野知一郎 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の炎症における腸管およびマクロファージ由来レジスチン関連タンパク (RELN) の役割 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 19 日 横浜
 21. 藤城緑、岩下未咲、中津祐介、大久保博史、張君、大谷裕一郎、迫田秀之、櫛山暁史、菊池貴子、西村英紀、門脇孝、浅野知一郎 マクロファージとの共培養系において Valsartan が脂肪細胞の遺伝子発現に与える影響 55 回日本糖尿病学会 2012 年 5 月 19 日 横浜

名称：大腸癌、動脈硬化症、又はメタリックド
ームの検出方法

発明者：浅野 知一郎

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特許、5429723

取得年月日：平成 25 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅野 知一郎 (ASANO TOMOICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教
授

研究者番号：70242063